The main way of infection is alimentary and airborne path. Colibacteriosis very often proceeds in the form of mixed infections with vector-borne gastroenteritis and rotaviral disease of pigs. Derivatives of furan and hynoxalin, gentamicin, laevomycetinum, tetracycline, ciprofloxacin possess the highest antibacterial activity against Escherichia coli and Salmonella, causing the bacterial disease in pigs.

УДК: 616-003.282:615.2

А.С. Зенкин, А.И. Леткин, А.В. Харлашкин, Ф.П. Пильгаев, Н.Ю. Калязина, А.П. Лащ

ГОУВПО «МГУ им. Н.П. Огарева», Аграрный институт, г. Саранск

ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНАЯ ЖИДКОСТЬ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО СРЕДСТВА

Предпосылки использования цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) в качестве биологически активного средства были даны А.П.Фридманом еще в1936-1940 гг. Им было показано, что при парентеральном введении ЦСЖ не оказывает вредного влияния на организм, не вызывает шоковых явлений, аллергических симптомов, анафилактического шока и не обладает несовместимостью. Она обладает десенсибилизирующими свойствами, перед ее трансфузией не требуется определять серологическую группу и пробу на совместимость. Срок консервации ЦСЖ значительно больше, чем крови. ЦСЖ обладает бактерицидностью и не содержит микробов. ЦСЖ может вернуть к жизни организм при кровопотере, достигающей 70%. Консервация, стерильность и стандартизация ЦСЖ хорошо обеспечиваются.

Известно, что цереброспинальная жидкость является составной частью центральной нервной системы. В ее состав входят многие низкомолекулярные биологически активные вещества (сопоставимые по размерам с наночастицами), синтезируемые как в ЦНС, так и периферических эндокринных органах. Широкий спектр биологически активных веществ в ЦСЖ вызвал интерес ряда исследователей с целью использования ее для модификации определенных функций в организме, в том числе для коррекции некоторых физиологических и патологических состояний (Атанова, 1953; Ткач и др., 1986 и др.).

Сотрудники кафедры незаразных болезней и радиологии Аграрного института Мордовского государственного университета (А.С. Зенкин, С.В. Лабинов, В.П. Лабинов, Ф.П. Пильгаев, А.И Леткин, Н.Ю. Калязина, А.П. Лащ, А.В. Макаров) в течение последнего десятилетия активно занимались изучением состава цереброспинальной жидкости крупного рогатого скота и оценкой биологических эффектов у различных видов животных при ее парентеральном введении. В настоящей статье представлены некоторые обобщенные сведения данного научного направления.

Цереброспинальную жидкость отбирали в ГУП РМ Развитие села Пищекомбинат «Саранский» от крупного рогатого скота. Фиксация животных проводилась с использованием различного фиксационного материала и приспособлений (веревок, носогубного зажима). Отбор проводили с учетом возраста, пола, физиологического и клинического состояния. Соблюдение правил асептики и антисептики при проведении операции достигалось предварительной стерилизацией инструментов и системы, обработкой места пункции (выстригали волосяной покров и обрабатывали антисептическими средствами) и свойствами разработанной на кафедре системы извлекать относительно стерильную жидкость.

Пункцию проводили между затылочной костью и атлантом, перпендикулярно к поверхности кожи. При пункции игла проходит последовательно - кожу, подкожную клетчатку, мощный слой мышц, выйную связку, атлантозатылочную мембрану и погружается в большую (заднюю) цистерну мозга. Прохождение мембраны ощущается как прокол листа бумаги. При удачно проведенной пункции ликвор обычно вытекает самотеком из просвета иглы пос-

ле удаления мандрена. Затем с помощью шприца, соединенного с трехходовым краном, ликвор по гибким прозрачным трубкам перекачивался в стерильную емкость. Разработанная на кафедре незаразных болезней и радиологии система позволяет извлекать у крупного рогатого скота различного возраста и пола до 350 мл ЦСЖ. При этом соблюдается стерильность жидкости и достигается безопасность операции.

Способ позволяет в различных условиях содержания животных извлекать необходимые количества ЦСЖ, а также повысить безопасность данной операции и достигать максимальной стерильности полученного материала.

На начальном этапе работы авторами были разработаны методические указания по экспериментальному и клиническому изучению ликвора крупного рогатого скота в качестве биологически активного средства в животноводстве (1999). Была разработана и предложена для практических целей система для отбора цереброспинальной жидкости (патент на изобретение № 2125470, 1997), которую в ходе дальнейших исследований усовершенствовали: «Устройство для отбора цереброспинальной жидкости» - (патент на полезную модель №64512 от 11.12.06).

Исследованиями установлено, что физико-химические свойства цереброспинальной жидкости КРС в зависимости от возраста и пола изменяются незначительно. Содержание низкомолекулярных фракций пептидов достоверно выше у телок и бычков, чем у коров. В цереброспинальной жидкости быков с увеличением возраста повышается активность АСТ, АЛТ, концентрация белка, инсулина и АКТГ. Уровень трийодтиронина и индекс свободного тироксина с возрастом понижаются. В ЦСЖ коров с возрастом снижается активность АСТ, концентрация трийодтиронина, инсулина и адренокортикотропного гормона, увеличивается активность АЛТ и концентрация эстриола и тироксина.

Проведена работа по вопросам рационального отбора ЦСЖ от разных половозрастных групп животных, разработки методов ее консервации; изучения пирогенных свойств и влияния на клинико-гематологические показатели (Ф.П. Пильгаев,1999). Результаты исследований свидетельствуют о том, что заморозка или применение консервантов способствуют сохранности ЦСЖ в течение одного года.

При исследовании клинико-гематологических показателей животных после применения ЦСЖ отмечено кратковременное повышение температуры тела, частоты пульса и дыхания, а в конце опыта – повышение весовых показателей. Гематологическая реакция на введение ЦСЖ проявлялась умеренным лейкоцитозом, эритроцитозом и повышением количества гемоглобина.

Изучено влияние ЦСЖ на морфофункциональные показатели семенников хрячков (Леткин А.И., 1999). В первой серии опытов поросятам в возрасте 2-2,5 месяца вводили ЦСЖ бесплодных коров в дозе: 1 группа – 20 мл внутримышечно, однократно; 2 группа – 40 мл внутримышечно, однократно; 3 группа – 20 мл внутримышечно, двукратно с интервалом 10 дней; 4 группа служила контролем. Во второй серии опытов поросятам вводили ЦСЖ стельных коров 4-6 месяцев беременности. За опытными поросятами наблюдали в течение 3 месяцев. Кастрацию хряков проводили через 1, 2 и 3 месяца после введения ЦСЖ. Установлено, что применение ЦСЖ вызывает деструктивные процессы в семенниках 1–2- месячных хрячков, проявляющиеся уменьшением относительной и абсолютной массы семенников, увеличением их плотности, уменьшением долевого вклада извитых семенных канальцев, сперматогенного эпителия и увеличением долевого вклада интерстициальной ткани (кастрационный эффект). Отмечена тенденция к нарастанию деструктивных процессов в семенниках. Так, наибольшие изменения выявлены через три месяца после двукратного введения ЦСЖ беременных коров.

Изучались вопросы влияния цереброспинальной жидкости на кроветворную систему кроликов при ее введении в области биологически активных точек (Калязина Н.Ю., 2002).

Проведенные исследования по применению цереброспинальной жидкости и квантового излучения показали, что ЦСЖ вызывает выраженную реакцию кроветворной ткани у кроликов. Изменения в периферической крови в зависимости от вида и интенсивности воздействия носят мобилизационный или стрессорный характер и не всегда коррелируют с реакцией кроветворной ткани. Установлена выраженная способность ЦСЖ и УФ - излучения стимулировать эритробластический росток кроветворения. Реакция миелобластического ростка на введение ЦСЖ и УФ - лучей неоднозначна и не носит постоянный характер. Особый интерес вызыва-

ют данные о повышении активности ЦСЖ при ее облучении УФ - лучами. Выявленный эффект позволяет предположить, что предварительное насыщение фармакологических средств энергией квантового излучения позволит существенно снизить применяемые дозировки. Отмечены также половозрастные особенности реакции кроветворной ткани.

При поддержке центра «Интеграция» проводились исследования по оценке возможности использования ЦСЖ как биологической субстанции для полной или частичной замены сыворотки крови крупного рогатого скота в ростовой среде при культивировании перевиваемых линий клеток (Лащ А.П., 2001).

В ходе выполнения данной работы была получена популяция клеток CV-1 (ВНИИВВиМ)-Л, способная к росту в среде ИГЛА MEM с содержанием 2,5% и 0,5% сыворотки крови и ЦСЖ крупного рогатого скота соответственно. Достигалось это путем поэтапного снижения концентрации сыворотки с 10% до 2,5% и добавлением ЦСЖ и дальнейшим понижением ее концентрации с 2,5% до 0,5%, в ростовой среде в течение 20 пассажей.

Произведена оценка некоторых биологических свойств полученной популяции клеток. Морфологические и кариологические исследования показали, что популяция клеток CV-1(ВНИИВВиМ)-Л была представлена клетками эпителиоподобного типа, полигональной формы с выраженной зернистостью цитоплазмы, четкими границами, округлым ядром. Интервал варьирования хромосом находился в пределах от 50 до 67, модальное число хромосом 60 при его величине 22% (2n=60). Исходная сублиния перевиваемых клеток CV-1 (ВНИИВВиМ) имеет интервал варьирования хромосом в пределах от 55 до 73, модальное число хромосом 68, при его величине 22% клеток.

Для более полной оценки ликвора, как составной части среды культивирования клеток и вирусов, проведен опыт на модели ЦСЖ и сыворотки крови свиньи, иммунизированных против КЧС и болезни Тешена на наличие в них антител к этим возбудителям. В результате этого эксперимента установлено, что в крови титр антител составил 1:512 к вирусу болезни Тешена и 1:32 к вирусу КЧС. В ЦСЖ антитела отсутствовали. Это говорит о перспективности использования ЦСЖ для культивирования клеток при получении различных диагностикумов.

Установлено, что стерилизация цереброспинальной жидкости через мембранные фильтры с размером пор 0,22 мкм, приводит к тому, что она не содержит бактерий, грибов и микоплазм, а ее хранение при температуре минус 20 °С сохраняет исходную биологическую активность в течение двух лет. Показано также, что ЦСЖ не обладает вирусингибирующим действием и не оказывает отрицательного влияния на репликацию вирусов бешенства и оспы овец в адаптированных культурах клеток. Установлено на перевиваемых линиях клеток почки теленка MDBK и почки сайги ПС, что введение в состав ростовой среды ликвора КРС повышает выход фертильных клонов. Это открывает новые возможности для более полного клонального анализа гетероплоидных линий клеток и получения новых оригинальных клональных линий клеток.

Предыдущими исследованиями созданы предпосылки для изучения использования ЦСЖ в искусственном осеменении свиней. Эффективность использования спермы в биотехнике размножения определяется её биологическими свойствами, основными из которых являются потенциальное «бессмертие», криоконсервация в жидком азоте и возможность заблаговременного, всестороннего контроля качества спермы. Методы криоконсервации спермы хряков в практике искусственного осеменения не внедрены.

В настоящее время на свиноводческих комплексах для осеменения свиней используют свежеполученную разбавленную сперму. Современные разбавители позволяют хранить сперму хряков при температуре 16-18 °С до 3 дней без снижения оплодотворяющей способности спермиев.

А.В. Харлашкин (2008) в своих исследованиях использовал ЦСЖ крупного рогатого скота как компонент синтетической среды для разбавления спермы хряков. Проведенная серия опытов позволила установить оптимальную дозу ликвора, повышающую выживаемость спермиев хряков.

Сперму получали от хряков пород крупная белая, ландрас, дюрок. Перед разбавлением проводили оценку качества спермы по общепринятым методикам. К пригодной к разбавлению сперме добавляли среду в соотношении 1:3. Использование спермы, приготовленной таким образом, возможно в течение трех суток.

При проведении опытов мы добавляли к такой сперме различные количест-

ва цереброспинальной жидкости крупного рогатого скота. Наилучший результат получен при добавлении к разбавленной 1:3 сперме хряков 1% цереброспинальной жидкости. Спермии выживают более 8 суток, сохраняя активность в 6 баллов до 7 суток.

Использование цереброспинальной жидкости как компонента среды - разбавителя позволяет использовать сперму хряков до 7 суток, повысить выживаемость спермиев в половых путях самок, а, следовательно, увеличить процент оплодотворенных свиноматок

Выводы.

1. Широкий спектр биологически активных веществ в ЦСЖ вызвал интерес ряда исследователей для использования ее при модификации определенных функций в организме, в том числе для коррекции некоторых физиологических и патологических состояний.

2. Разработаны методические указания по экспериментальному и клиническому изучению ликвора крупного рогатого скота в качестве биологически активного средства в животноводстве (1999).

3. Разработана и предложена для практических целей система для отбора цереброспинальной жидкости (патент на изобретение № 2125470, 1997), а также «Устройство для отбора цереброспинальной жидкости» (патент на полезную модель №64512 от 11.12.06).

4. После применения цереброспинальной жидкости поросятам отмечено кратковременное повышение температуры тела, частоты пульса и дыхания, а в конце опыта – повышение весовых показателей. Гематологическая реакция на введение ЦСЖ проявлялась умеренным лейкоцитозом, эритроцитозом и повышением количества гемоглобина.

5. На перевиваемых линиях клеток почки теленка MDBK и почки сайги установлено, что введение в состав ростовой среды ликвора КРС повышает выход фертильных клонов. Это открывает новые возможности для более полного клонального анализа гетероплоидных линий клеток и получения новых оригинальных клональных линий клеток.

6. Установлена выраженная способность цереброспинальной жидкости и ультрафиолетового излучения стимулировать эритробластический росток кроветворения.

7. Использование цереброспинальной жидкости как компонента среды - разбавителя позволяет использовать сперму хряков до 7 суток, повышает выживаемость спермиев в половых путях самок, что, следовательно, может увеличить процент оплодотворенных свиноматок.

Таким образом, накапливаются данные о применении цереброспинальной жидкости крупного рогатого скота в качестве биологически активного средства.

РЕЗЮМЕ

Получены данные о применении цереброспинальной жидкости крупного рогатого скота в качестве биологически активного средства для коррекции определенных физиологических и патологических состояний. Показана перспективность применения цереброспинальной жидкости в клеточной биотехнологии.

SUMMARY

The results obtained show that cattle cerebrospinal fluid as biologically active substance can be used for correction certain physiological and pathological states. Data prove advanced use of cerebrospinal fluid in cell bioengineering.

Литература

1. Атанова Е.М. Применение гетероликвора в акушерской практике: Автореф. дисс. док. мед. наук. Куйбышев., 1954. 37 с.
2. Ткач В.В., Зяблов В.И., Сивуха Н.И., Королев В.И., Ивахнеко В.Н., Барсуков Н.П., Волков Д.К., Балабанов С.А., Алданов Н.А., Сагаконь В.В., Бондаренко В.И. Влияние прижизненно взятой ксеногенной спинномозговой жидкости крупного рогатого скота на динамику развития свиней/Морфология некоторых органов и тканей человека и млекопитающих. Тр. Крымского мед. ин-та. Симферополь., 1986. С. 9-16.
3. Система для отбора цереброспинальной жидкости: Патент на изобретение №2125470, приоритет от 12.03.97 г./Зенкин А.С., Пильгаев Ф.П., Гришин А.И., Леткин А.И., Денисов В.Г., 4 с.: ил.
4. Устройство для отбора цереброспинальной жидкости: Патент на полезную модель №64512, приоритет от 11.12.06 г./Зенкин А.С., Калязина Н.Ю., ХарлашкинА.В.
5. Зенкин А.С., Бударков В.А., Боченков В.Ф., Денисов В.Г. Пильгаев Ф.П., Леткин А.И. Белкин С.В., Лабинов С. В. Экспериментальное и клиническое изучение ликвора крупного рогатого скота в качестве биологически активного средства в животноводстве. //Методические указания. Саранск, 1998. 15 с.
6. Пильгаев Ф.П. Морфофункциональные изменения крови и щитовидной железы свиней при применении цереброспинальной жидкости: Дис...канд. вет. наук. Саранск.,1999. 151 с.
7. Леткин А.И. Морфофункциональные изменения крови и половых желез хряков при применении цереброспинальной жидкости. Дис...канд. вет. наук. Саранск., 1999. 165 с.
8. Калязина Н.Ю. Влияние цереброспинальной жидкости и УФ излучения на морфофункциональное состояние костного мозга. Дис. канд.

вет. наук. Саранск., 2002. 148 с.
9. Лащ А.П., Зенкин А.С. Перспективы применения цереброспинальной жидкости как компонента питательных сред/ Матер. Научн. Конф. «XXX Огаревские чтения». Саранск, 2001. С. 169-171.
10. Харлашкин А.В. Использование цереброспинальной жидкости при искусственном осеменении свиней./Материалы VIII научной конференции молодых ученых. Саранск, 2008. С. 69-70.

УДК: 576.858.083.35:57.085.23

К.В. Кулешов, О.М. Гринкевич, Р.Я. Подчерняева, Л.П. Дьяконов
ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко РАСХН (ВИЭВ);
ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН

ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ВЫСОЧУВСТВИТЕЛЬНЫМИ МЕТОДАМИ АНАЛИЗА ДНК

Введение

Использование клеточных культур в различных областях фундаментальной и прикладной науки требует надежных критериев стандартизации и оценки соответствия культивируемых клеток первоначально полученным линиям (Новохатский и др., 1976; 1979; Царева и др., 1986). Использование клеток с отсутствием идентификационных характеристик ставит под сомнение объективность полученных результатов. Для решения данных проблем необходимо развитие подходов, связанных с тщательной и полной разработкой процедуры идентификации клеточных линий. Важными являются научная обоснованность и возможность стандартизации используемых методик и подходов.

В настоящее время для контроля видовой идентичности клеточных линий применяются кариологический и изоферментный методы, но они достаточно трудоемки и обладают меньшей чувствительностью и возможностью стандартизации в сравнении с современными методами, основанными на полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Buehring et al., 2004; Gilbert et al., 1990; Kaplan and Hukku, 1998). Одним из наиболее существенных преимуществ ПЦР является высокая аналитическая специфичность, чувствительность и возможность стандартизации анализа результатов различных лабораторий.

Объектом нашего исследования являлись клеточные линии, полученные от разных видов животных, и депонированных в лаборатории культур тканей НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН. Для идентификации клеточных линий банка клеток нами предложено применение двух подходов. Первый – универсальная методика видовой идентификации, базирующаяся на концепции «Штрих-код жизни» (Armstrong and Ball, 2005; Hebert and Gregory, 2005). Существо метода сводится к секвенированию 650-нуклеотидной последовательности 5’-концевого участка гена митохондриальной ДНК (мтДНК). Второй подход – анализ видовой принадлежности каждой клеточной линии с использованием разработанной в лаборатории клеточной биотехнологии ВИЭВ видоспецифической ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной (ГФ) детекцией в режиме реального времени. Метод позволяет идентифицировать следующие виды животных: *Homo sapiens* (человек), *Sus scrofa* (свинья), *Bos taurus* (корова), *Canis familiaris* (собака), *Felis catus* (кошка), *Cercopithecus aethiops* (африканская зеленая мартышка), *Equus caballus* (лошадь), *Oryctolagus cuniculus* (кролик), *Ovis aries* (овца), *Mesocricetus auratus* (золотистый хомяк), *Mus musculus* (мышь), *Rattus norvegicus* (серая крыса), *Cricetus gricetus* (китайский хомяк).

Материалы и методы

Культуры клеток

Объектом исследования служили линии клеток млекопитающих, депонированные в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН.

Амплификация и секвенирование участка COI гена.